

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-253854

(43) 公開日 平成6年(1994)9月13日

(51) Int.Cl. C 12 N 15/54	識別記号 Z N A	序内整理番号 1/21 9/10	F I	技術表示箇所
C 12 P 19/38		7236-4B 9359-1B 7432-4B 9050-1B	C 12 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 9 FD (全 19 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願平5-63515	(71) 出願人	000006770	ヤマサ醤油株式会社
(22) 出願日	平成5年(1993)2月26日	(72) 発明者	野口 利忠	千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
		(72) 発明者	奥山 康	千葉県銚子市西小川町4399番地6号
		(72) 発明者	浜本 智樹	千葉県佐倉市鏡木町2丁目6番地13号
		(72) 発明者	緑川 祐一郎	千葉県銚子市新生町2丁目2番地1号
		(72) 発明者		千葉県銚子市海鹿島町5201番地7号

(54) 【発明の名称】 組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの製造法

(57) 【要約】

【目的】 ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた効率的なヌクレオシドアナログ合成を可能とするため、組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの大規模製造を目的とする。

【構成】 スクレナシド・ホスオリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子、それを用いた組換えDNA手法によるスクレオシド・ホスホリラーゼの製造、および該方法で得られた培養物、微生物菌体、またはその処理物を酵素源として使用するスクレオシドの製造法に関する、

〔特許請求の範囲〕
〔請求項1〕 一頭のマウス由来の好熱菌由来のDNA分子を有するDNAs。

記式1 以下の如きの酸配列をコードするペリミジンヌ

10 * [式1]
20
MetAsnAngThmIleAlaGluGlnAlaAlaIlePheLeuAspCysPheProThrSer
30 40
PheGlnIleGlyAspIleLeuGlySerGlyLeuGlyValLeuIleAspGluIleGlyIle
50 60
AlaValLysIleProTyrosSerAspIlePheAspPheProValSerThrValGluGlyHis
70 80
AlaGlyIleLeuValIleGlyGlyIleLeuIleAspIleLeuIleAlaValMetGlnGlyArg
90 100
PheIleSerTyrGlyAspIleGlySerAspIlePheAspIlePheProValArgValMetLys
110 120
AlaAspGlyValIleAspIleLeuIleAspIleAspIleAlaGlyValAsnGluSerPhe
130 140
GluProGlyAspLeuMetIleIleSerIlePheAspIleAspIleAsnMetGlyGlyAsnProLeu
150 160
IleGlyPheAsnAspSerAlaLeuGlyValArgPhePheAspMetSerGluAlaTyrSer
170 180
LysArgLeuArgGlnLeuAlaLysAspValAlaAsnAspIleGlyLeuArgValArgGlu
190 200
GlyValTyrValAlaAsnThrGlyProAspTyrGluThrProAlaGluIleArgMetIle
210 220
ArgValMetGlyGlyAspAlaValGlySerSerIleValProGluValIleValAlaArg
230 240
PheAlaGlyMetGluValIleGlyIleSerCysIleSerAsnMetAlaAlaGlyIleLeu
250 260
AspGlnProLeuThrIleAspGluIleIleGluIleIleGlyValLysAlaAspPhe
270 280
AspArgPheValLysAlaIleValArgAspMetAlaLysAsp

（I）

〔請求項2〕 ペリミジンヌクレオシド・ホスホリーゼ構造の記式1の如きの酸配列をコードするペリミジンヌ
造造伝子の上流にS引配列を有する。請求項1記載のペリミジンヌクレオシド・ホスホリーゼ構造造伝子を含むDN
A分子。

〔請求項3〕 ペリミジンヌクレオシド・ホスホリーゼ構造由来のDNA分子。

特開平6-253854

(3)	(4)	特開平6-253854
3	4	
10	20	
Met Arg Met Val Asp Leu Ile Gln Lys Lys Arg Asp Gly His Ala Leu Thr Lys Glu Glu		
30	40	
Ile Gln Phe Ile Ile Glu Gly Tyr Thr Lys Gly Asp Ile Pro Asp Tyr Gln Met Ser Ala		
50	60	
Leu Ala Met Ala Ile Phe Phe Arg Gly Met Asn Gln Glu Cys Thr Ala Glu Leu Thr Met		
70	80	
Ala Met Val His Ser Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ser Arg Ile Glu Gly Ile Lys Val Asp		
90	100	
Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Thr Thr Thr Leu Val Leu Gly Pro Leu Val Ala		
110	120	
Ser Val Gly Val Pro Val Ala Lys Met Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr		
130	140	
Ile Asp Lys Leu Glu Ser Val Pro Gly Phe His Val Glu Ile Thr Asp Asp Glu Phe Ile		
150	160	
Asp Leu Val Asn Lys Asn Lys Ile Ala Val Val Gly Gln Ser Gly Asn Leu Thr Pro Ala		
170	180	
Asp Lys Lys Leu Tyr Ile Leu Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asn Ser Ile Pro Leu Ile		
190	200	
Ala Ser Ser Ile Met Ser Lys Ile Ala Ala Gly Ala Asp Ile Val Leu Asp Val		
210	220	
Lys Thr Gly Val Gly Ala Phe Met Lys Asp Leu Asn Asp Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala		
230	240	
Met Val Asp Ile Gly Asn Arg Val Gly Arg Lys Thr Met Ala Ile Ile Ser Asp Met Ser		
(II) その1		

【式3】

(11) 252

【請求項4】 ピリミジンタクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の上流にSD配列を含有する、請求項3記載のcDNA分子。

【請求項5】 細胞内で複製可能なベクターの発現制御シグナルの下流に請求項1および/または3記載のDNAb分子を組み込んでなる、組換えベクター。

【請求項6】 発現制御シグナルが大腸菌内で作用するプロモーターを少なくとも含むものである、請求項5に記載の組換えベクタ。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の組換えベクターで形質転換された化質転換体を培養して当該酵素を生産させた、好熱菌由來のスクレオンド・オスマリーゼを保持する微生物菌体を含有する培養物。

【請求項8】 前記の培養物から分離した好熱菌由來のヌカレオシド・オフホリューゼを保持する微生物菌体、またはその処理物。

(請求項4) 嘌基併存体、糖残基併存体及び(1)酸併存体を含むオレイン、オレオノマーを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塌基併存体の塌基部と糖残基併存体の糖部分との間にペーパーハイド結合を形成させてヌクレオシドを製造する方法において、ヌクレオシド・ヌクレオチドを含有する酵素調製物として請求項7または8記載のものを使用することを特徴とする、ヌクレオシドの製造法。

【発明の詳細な説明】

$$\{0\ 0\ 0\ 1\}$$

【産業上の利用分野】 本発明は、パインラス菌に属する好熱菌由来のスクレオシド・ホスホリラーゼの組換えDNAsによる製造法および該方法で得られた酵素のスクレオシド製造への応用に関するものである。

300021

【従来の技術】核酸系化療法剤は、抗腫瘍、免疫抑制、抗ウイルスなどの種々の用途に使用されている。また、近年のエイズの流行とともにヌクレオシドアナログの抗ウイルス作用が着目され、種々のヌクレオシドアナログが合成され、その抗ウイルス活性が試験されている（化学と生物、第32巻、第6号、第356～361頁）。従来、これらのヌクレオシドアナログの多くは化学的に合成されてきたが、微生物由来のヌクレオシド、ヌクレオチド、ペリオ酸を利用することにより数々のヌクレオシドアナログを効率よく調製できる事が明らかになるに至り、核酸素の利用はヌクレオシドアナログ合成の重要な手段となっている（発酵と工業、第35巻、第11号、第927～937頁）。

〔0.0.0.3〕 一般に、酵母の調製株としては操作性ある

は経済性、我が小微生物が有利である。又、オーバー、オーバー、オーバー等は、動物、微生物など種々の生物に存在することが確認されており、そのいくつかは半離精製

さて酵素学的諸性質が報告されている。たとえば、バシラス属に属する好熱菌の一種であるバシラス・ステアロサーキュラス (*Bacillus stearothermophilus*) に関する研究でも、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの存在が確認されている。すなわち、プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2.4.2.1.)、ビリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2.4.2.2.) とも該菌より単離精製され、その諸性質も報告され (J. Biol. Chem., 244, 3691 (1969), Agric. Biol. Chem., 53, 2205 (1989), Agric. Biol. Chem., 53, 3219 (1989))、それらの酵素を利用したヌクレオシドアナログの合成も報告されている (Agric. Biol. Chem., 53, 197-202 (1989)、特開昭56-16619号公報、特開昭56-16479号公報、特開平1-320995号公報)。

【0004】山内らは、バシラス属に属する好熱菌から耐熱性があり活性が高いヌクレオシド・ホスホリラーゼ (プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びビリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ) を有するバシラス・ステアロサーキュラス (*Bacillus stearothermophilus*) T-H6-2株を見いだし、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを単離するに成功した (国際特許公開WO 90/10080号、日本農芸化学会誌、第63巻、第3号 (1989年度大会講演要旨集)、第283頁)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】山内らの見いだした上記の酵素は極めて優れた酵素ではあるが、ヌクレオシド製造の酵素源として上記微生物の菌体自身を使用する場合、胞子形成に伴う自己溶菌により反応液中に酵素が離脱し、ヌクレオシドの連続的な合成に悪影響を及ぼしたり、溶菌に伴う菌体蛋白質の流出がヌクレオシドの合成および精製に支障をきたすという欠点を有していた。また、微生物の菌体を酵素源として使用する場合の一般的な問題として、菌体内に含まれる種々の酵素により基質

もし、は生成物の分解などの副反応が生じ、生成物の收率の低下を招くという問題があることを常に認識しておかなければならない。

【0006】このような微生物菌体を酵素源として使用する方法の問題点を解決するため、精製酵素標品を酵素源として用いる方法も考えられてはいるが、バシラス・ステアロサーキュラスは、蛋白質分解活性を有し、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量も少なく、かく該酵素の精製操作も煩雑であることから、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを收率よく回収することは事实上困難なことであった。

【0007】上記の問題を克服するための第一歩として、山内はバシラス・ステアロサーキュラス由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片を大腸菌にクローン化し、当該酵素が大腸菌において生産できることを見いだした (特開平4-4882号公報)。しかしながら、該方法で造成された組換え大腸菌におけるヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量は好熱菌におけるその生産量と同等以下であり、これをヌクレオシド製造の酵素源として使用したとしても、到底実用化に耐えうるものではなかった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、バシラス・ステアロサーキュラス由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードするDNAの一次構造を解析し、この解析結果をもとに組換えDNA手法により大腸菌において該酵素を大量生産させることに成功し、本発明を完成させた。

【0009】すなわち、本発明は、バシラス属に属する好熱菌に由来し、下記式(1)のアミノ酸配列をコードするプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子に関するものである。

【0010】

【式1】

MetAsnGlnValLeuCysGlyAlaLysPheLysAspGlySerProThrSer	30
AspGlyAspGlyLeuIleLeuGlySerGlyLeuGlyAlaAspGlyIleGlyIle	40
ProGlnIleGlyIleIleLeuGlySerGlyLeuGlyAlaAspGlyIleGlyIle	50
AlaIleGlyIlePheGlySerAspIlePheAsnGlyPheProAlaSerThrValGluGlyIle	60
AlaGlyIleGlyIleGlyGlyGlyIleLeuIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	70
PheIleGlyIleGlyGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	80
AlaGlyIleGlyIleGlyGlyGlyIleLeuIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	90
PheIleGlyIleGlyGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	100
PheIleGlyIleGlyGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	110
AlaGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIleGlyIle	120
GlyProGlyAspLeuMetIleSerAspIleAsnAsnMetGlyAsnProLeu	130
IleGlyProAsnAspSerAlaIleGlyIleAsnGlyPhePheAspMetSerGlyIleAsnSer	140
IleGlyProGlyAspLeuMetIleSerAspIleAsnAsnMetGlyAsnProLeu	150
IleGlyProAsnAspSerAlaIleGlyIleAsnGlyPhePheAspMetSerGlyIleAsnSer	160
LysArgIleGlyGlyIleLeuIleGlyIleAspValAlaAsnAspIleGlyIleLeuGlyIleArgGly	170
GlyIleGlyIleLeuIleGlyIleAspValAlaAsnAspIleGlyIleLeuGlyIleArgGly	180
GlyIleGlyIleLeuIleGlyIleAspValAlaAsnAspIleGlyIleLeuGlyIleArgMetIle	190
ArgIleMetGlyGlyAspAlaValGlyIleSerThrValProGluValIleValAlaArg	200
ArgIleMetGlyGlyAspAlaValGlyIleSerThrValProGluValIleValAlaArg	210
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	220
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	230
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	240
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	250
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	260
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	270
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	280
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	290
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	300
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	310
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	320
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	330
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	340
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	350
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	360
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	370
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	380
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	390
AspGlyIleSerGlyIleAspGlyIleAspGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSerGlyIleSer	400

C.I.

【0011】また、本発明は、バクテラ属に属する好熱菌に由来し、下記式-1-1のアミノ酸配列コードをコードするゼオリミクスケレオンド・カスホリカの構造遺伝子

を含有するDNA分子に関するものである。

【0012】

【式1】

〔式6〕

(II) その2

【0.0.1.3】さらに、本発明は、細胞内で複製可能なベクターの発現制御シグナルの下流に上記メクレオシド・ホスホリーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子を組み込んでなる組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された細胞を培養して当該酵素を生産させた好熱菌由來のスクレオシド・ホスホリーゼを保持する微生物菌体を含有する培養物、および該培養物から分離した好熱菌由來のスクレオシド・ホスホリーゼを保持する微生物菌体もしくはその処理物に関するものである。

〔0014〕さらにまた、本発明は、塩基供与体、糖残基供与体及びチオ酸供与体をスケレオリド、オフナリドゼを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塩基供与体の塩基部分と糖残基供与体の糖部分との間にペーパークロシド結合を形成させてスクレオンドを製造する方法において、又ケレオリド、オフナリドゼを含有する酵素調製物として上記培養物または上記微生物両体を、またはその処理物を使用することを特徴とするスクレオンド製造法に関するものである。

【0015】以下、本発明について詳述する。なお、本明細書における以下の用語は下記の定義で用いられている。**「パンチラ風に属する好熱菌由来」**とは、DN A分子の塩基配列が**パンチラ風に属する好熱菌**の遺伝子のそれと実質的に同じであるということを意味するものである。

30 って、必ずしも本発明によるDNA断片がバシラス属に属する好熱菌から抽出されたものに限定されることを意味するものではない。「塩基配列が実質的に同じ」とは、スクレオニド・ホスホリラーゼとしての遺伝情報が維持されている限り、いくつかの単位ヌクレオチド（塩基）の置換、欠失及び、または付加があってもよいことを意味する。

【0016】1. ネクレオシド、ホスホラーゼ構造遺伝子を含有するDN_A分子
本発明におけるバシス属に属する好熱菌由来のネクレオシド、ホスホラーゼ構造遺伝子を含有するDN_A分子とは、上記式(1)～(6)及び(8)または式(1)～(6)のアミノ酸配列をコドンとするネクレオシド、ホスホラーゼ構造遺伝子を含有するものであり、その具体的な塩基配列は特に限定されるものではない。たとえば、図1に示す核酸酵素地図に規定されるDN_A分子により具体的に、式(1)～(6)のネクレオシド、ホスホラーゼ構造遺伝子を含有するDN_A分子としては、図1に示すように切断されるものを、比「ミクレオシド、ホスホラーゼ構造遺伝子を含有するDN_A分子」としては以下と呼ぶ。ここで「」で切断されるものを、ブリヌクレオシド、ホスホラーゼ遺伝子を含有するDN_A分子としては以下と呼ぶ。R₁～R₅は、ゼオロ、ゼオロゼオロ、ミクレオシド、ホスホラーゼの両構造遺伝子を含有するDN_A分子としてはR₁～R₅と目す。R₁～R₅で切断され、そのものをそれを例にす

ことができる。

【0017】このようなDNA分子は、スクレオシド・オスホリラーゼの構造遺伝子の他に少なくとも構造遺伝子の上流にSD配列を含有するものであり、構造遺伝子のみを含有するDNA分子を使用した時と比較してスクレオシド・オスホリラーゼの生産量を著しく増加させることができる点で、本発明の目的にかなうものである。従って、本発明方法においては、図2-4に示す塩基配列中の少なくともSD配列から終止コドンまでの塩基配列を含有するDNA分子を使用することが肝要である。なお、ブリヌクレオシド・オスホリラーゼおよびビリミジンスクレオシド・オスホリラーゼの両酵素を生産させる場合には、そのDNA分子中の構造遺伝子の上流にSD配列が少なくとも一つ存在するものを使用すればよい。

【0018】なお、図1における「punA」は(+)スクレオシド・オスホリラーゼをコードする遺伝子(822 bp, 274個のアミノ酸からなる分子量29,637のボリペプチドをコードする)、「psol」はビリミジンスクレオシド・オスホリラーゼをコードする遺伝子(1,198 bp, 433個のアミノ酸からなる分子量46,271のボリペプチドをコードする)を示す。本発明者らによる解説では、両遺伝子はクラスターをなしており、それそれその翻訳開始に必要なリボソーム結合部位を有しているが、その近傍の上流に好熱菌のプロモーター構造及び大腸菌で機能できるようなプロモーター構造を有していない。

【0019】このようなDNA分子は、先の山内の方法(特開平4-4882号公報)などにより高温でのスクレオシド分解活性を指標としてパンラス属に属する好熱菌からクローニングすることができる。あるいは通常よく行われるように、パンラス属に属する好熱菌由來の精製したスクレオシド・オスホリラーゼのアミノ末端など的一部アミノ酸配列を既知の方法で決定し、もしくは上記式(I)および(II)または式(I)のアミノ酸配列の一部の配列を参考にし、それに相当するオリゴスクレオシドを合成し、該オリゴスクレオチドをプローブとしてパンラス属に属する好熱菌の遺伝子をよりスクレオシド・オスホリラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片を選出する方法も採用できる。クローニングに用いる宿主は特に限定されないが、操作性及び簡便性から大腸菌を宿主とするのが適当である。さらに、図2-4を参照して通常のDNA合成機を用いて化学的に合成してもかまわない。

【0020】通常、プラスミドベクターなどにこれらの断片をクローニングしても、該DNA断片はプロモーターを有していないか、あるいはプロモーターを有していても異種微生物内で効率的に機能できないことが多い。コードされた遺伝子の高発現は通常起こらないとされている。また、クローニング領域以外の余分なDNAを有していると、たとえ「ラミドベクター」上に存在している

他の遺伝子のプロモーターからのリードスルー(read-through)転写によっても、その発現が起こりうることがあり、好ましいことではない。このため、目的とする遺伝子の高発現を具現化するためには、クローニングしたDNA断片の塩基配列を解析し、該遺伝子のクローニング領域を特定し、宿主微生物に応じて該遺伝子が微生物菌体中で高発現可能となるように発現制御シグナル(転写開始及び翻訳開始シグナル)をその5'上游に連結した組換え発現ベクターを作製する必要がある。DNA塩基配列の決定は、常法により行うことができ、たとえばマキサム-ギルバーの方法(Methods in Enzymology, 65, 439(1980))もしくはダイデオキシチミヌクレオチド法(Methods in Enzymology, 101, 20(1983))などを応用して行うことができる。

【0021】2) 組換えベクター
スクレオシド・オスホリラーゼ遺伝子を異種微生物内で大量発現させるために使用する発現制御シグナルとしては、人為的制御が可能で、スクレオシド・オスホリラーゼ遺伝子の発現量を飛躍的に上昇させるような強力な転写開始並びに翻訳開始シグナルを用いることが望ましい。このような転写開始シグナルとしては、宿主として大腸菌を用いる場合には、lacプロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21 (1983), Gene, 20, 231 (1982))、trcプロモーター(J. Biol. Chem., 260, 3-39(1985))などを、酵母を宿主とする場合にはグリセルアルデヒト-3-オスマフェート・デヒドロゲナーゼ(J. Biol. Chem., 254, 2078 (1980))や抑制性酸性ホスファターゼ(Nucl. Acids Res., 11, 1657(1983))などの遺伝子の発現制御シグナルを例示することができる。

【0022】ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、微生物菌体内で複製可能であり、適当な薬剤耐性マーカーと特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベクターを使用するのが望ましい。具体的に大腸菌を宿主とする場合には、pBR322(Gene, 2, 95 (1973))、pUC18, pUC19(Gene, 33, 103(1985))などを例示することができる。また、酵母を宿主とする場合には、YEp13 (ATCC 37115)、YEp24 (ATCC37051)などを例示することができる。スクレオシド・オスホリラーゼ構造遺伝子の調製、クローニングした遺伝子と発現制御シグナルとの連結などの方法は、一般の技術者、特に分子生物学、遺伝子生物学の分野に属する技術者にとつては周知の技術であり、具体的には、例えは「Molecular Cloning」(Maniatisら編, Cold Spring Harbor, New York (1982))に記載の方法に従って行なうことができる。

【0023】3) 断片組換えの作製と培養
作製した組換えベクターを用いて微生物を断片組換えする。宿主となる微生物としては安全性は高く取扱いやす

いものであるが特に規定されない。例えば、大腸菌、酵母など、これら細胞を操作に常用されて、宿主生物を使用することができる。その中でも、大腸菌が取扱い上、及ぼスクリオシドアナログ合成に有利である。例えば細胞のDNA実験に使用されるE12株、O600菌、JM109菌、「M13」菌などが使用可能である。微生物を利用転換する方法はすでに多くの方法が報告されており、宿主として使用する微生物に応じて適切選択すればよい。例えば大腸菌を宿主として使用する場合、低温下、凍結乾燥、アム処理して菌体内にプラスミドを導入する方法（「Mol. Biol. Rep.」13(1986)）によれば大腸菌を用いて転換することが可能である。また、轉換を宿主とする場合には、アフターフィルタ法（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(1979) 11835）、あるいはアフターフィルタ・金属処理法（J. Bacteriol. 159(1983)）などのものを採用することができる。

【0024】得られた形質転換体は、当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらに脱分化したスクレオシド・ホスホリゲン酸遺伝子の発現を誘導して菌体内に該酵素が大量に蓄積するまで培養を行う。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの当該微生物の増殖に必要な栄養原を含有する培地を用いて常法に従って行えばよい。例えば、大腸菌を宿主として使用する場合、培地として2×YT培地（Methods in Enzymology, 100-20(1983)）、LB培地、M9+A培地（Molecular Cloning, 前述）などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、20～40℃の培養温度で必要により通気、攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中ににおけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じ、アンビシリン、テトラサイクリンなど）の薬剤を適当量培養液に加えて培養する。

【0025】培養中にスクレオシド・ホスホリゲン酸遺伝子の発現を誘導する必要がある場合には、用いたベクターで常用されている方法で該遺伝子の発現を誘導する。例えば、lacZプロモーターやlacZプロモーターを使用した場合には、培養中期に発現誘導剤であるイソツブリューフォロカルボキシルトリビラシド（以下、「I」等と略称する）を適当量添加する。また、使用するプロモーターが構成的に転写活性を有する場合には、特に発現誘導剤を添加する必要はない。スクレオシド・ホスホリゲン酸遺伝子の発現を誘導した後、該遺伝子産物を菌体内に大量蓄積させるため、さらに数時間の培養を継続して酵素誘導としての培養物を得る。得られた培養物はスクレオシドアナログ合成の酵素源として使用できる。

【0026】4. 培養菌体及びその処理物

組換え菌は、培養後膜分離あるいは遠心分離処理などによりその菌体を回収する。培養菌体そのものを酵素源として使用する場合、回収菌体を適当な緩衝液に懸濁して直接スクレオシドアナログの合成に使用できる。また、

酵素的、物理的方法、アグロコンを用いた場合には、回収菌体は、生産されたスクレオシド・ホスホリゲン酸を調製すればよい。例えば、回収した菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、ブレンチザイズ処理などによく物理的に菌体を破砕するか、あるいは「ザイム」処理など酵素的に溶解させ、菌体残渣を遠心分離により除去して無細胞抽出液を調製する。無細胞抽出液内に該酵素は強制にならかしていいるため、無細胞抽出液そのものを酵素標品として使用することができる。さらに精製が必要とされる場合でも、熱処理、疏安塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種グリセロラシフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、または複数の複数種類の酵素精製に組み合わせた、即ち酵素手段でスクレオシドアナログ合成に好適な高度に精製された酵素標品を調製できる。なお、大腸菌を宿主微生物とする場合、無細胞抽出液を熱処理（60～80℃で1～2時間）する上はほとんどの大腸菌由来蛋白質が変性し、遠心分離操作によく簡単に除去でき、非常に効率的な酵素の精製が可能である。

【0027】5. スクレオシド・アナログの合成

本発明のスクレオシド・アナログの合成は、上記の培養物または上記の培養菌体もしくはその処理物を使用することと特徴とするものであり、その他の条件方法は公知の方法（たとえば、国際特許公開WO90/10080号参照）に準じて行えばよい。すなわち、使用する酵素の最適条件を予備試験により設定し、この条件下で原料化合物と培養物または培養菌体もしくはその処理物とを反応させることにより実施することができる。さらに具体的には、反応温度としては30～95℃、反応時間としては3～10から適宜至適条件を選択し、適当量の無機リン酸を含有する適当な緩衝液に糖残基供与体としてスクレオシド及び塩基供与体として塩基アナログなどを添加し、設定条件下で反応させることにより行うことができる。反応終了後、合成されたスクレオシドアナログは核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法を適宜組み合わせて精製単離することができる。

【0028】

【発明の効果】本発明により前述した従来の問題点が解決され、バシラス属に属する好熱菌由来のスクレオシド・ホスホリゲン酸を用いた効率的なスクレオシドアナログ合成が可能となった。すなわち、本発明は下記の利点を有する。

すなわち、微生物菌体を酵素源として、副反応の少ない効率的なスクレオシドアナログ合成が可能となる。バシラス属に属する好熱菌由来のスクレオシド・ホスホリゲン酸を合成する場合、スクレオシド・ホスホリゲン酸以外の基質あるいは生成物分解酵素も耐熱性を有するため、高温時の反応でも副反応が進行する。しかしながら例えば、宿主微生物として大腸菌を用いて高温で合成反応を行えば、大腸菌由来の酵素はそのほとんどが失活

し、副反応はほとんど生じない。また、大腸菌などを宿主微生物とすれば、従来の自己溶菌の問題は解決される。さらに、組換え菌においては好熱菌由来スクレオシド・ホスホリラーゼが大量生産されているため、合成反応に使用する菌体量は少量で充ててあり、経済的にも効率的なスクレオシドアナログ合成が可能となる。

【0029】(D) 酵素大量調製が簡便となり、酵素的スクレオシドアナログ合成の実用化が可能となる。従来のバクテリス属に属する好熱菌からのスクレオシド・ホスホリラーゼの調製は極めて困難であったが、組換えDNA手法により該酵素を大量生産させることで、その大量調製は極めて簡便となる。例えば、大腸菌を宿主微生物とすれば、リバチーム処理あるいは超音波処理などの簡便な操作で高収率で該酵素を抽出できる。また該酵素は耐熱性を有することから、熱処理を施すことで、副反応に関与する大腸菌酵素を失活除去させることができ、簡便な操作で活性の高い酵素標品を調製することも可能である。ブリックレオシド・オホリラーゼ及びピリミジンスクレオシト・オホリラーゼ両酵素を用いてスクレオシドアナログを合成する場合、どちらかの酵素が関与する反応が律速となり、効率的な反応が生じない現象がある。しかし、好熱菌からは一定の比率でしかブリックレオシド・オホリラーゼとピリミジンスクレオシドホスホリラーゼが調製されず、その比率を変えることは極めて困難であった。しかしながら、両酵素を組換えDNA手法で別々に生産することにより、その比率を改変して効率的なスクレオシドアナログ合成を行うことも可能となる。このように、本発明はスクレオシドアナログの効率的な製造を実用化するものであり、産業上きわめて有益なものである。

【0030】

【実施例】以下、*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株(微生物研究第2758号)由来のスクレオシド・オホリラーゼに関して実施例をあげ、具体的に説明する。また、本実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4-DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」(前述)に従って行った。また、各種制限酵素、T4-DNAリガーゼ、プラスミドベクターpUC18及びpUC19、pPS11(リンクー並びにキロシークエンス用デリーナンキットは全て宝酒造(株)より入手した。

【0031】実施例1 好熱菌スクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子のDN塩基配列の決定

先に山内らにより調製された好熱菌*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株由来のブリックレオシド・オホリラーゼとピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有する4.6 kbのDNA断片(図1参照、特開平4-1882)、この断片が挿入されたpUC119プラスミドを保持する大腸菌K-12株エシエリシア・コ

リK-Y-2は平成2年1月11日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、微研菌寄第11197号の受託番号を受けている)よりブリックレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有すると思われる2.4 kbのSacI-EcoRV DNA断片をpUC119及びpUC119にセブクローン化した。該組換えプラスミドをキロシークエンス用デリーナンキットを用いて、文献(Gene, 28, 351(1984))の方法に従って当該挿入部分の一部が脱落し、異なる鎖長を持った種々のクローニングを作製した。得られた種々のクローニングの挿入断片について、ダイディオキシチニティダーマーマーマー法(Science, 214, 1295(1982))によりDNA塩基配列を決定した。その結果、図2に示すブリックレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子のDNA配列を得た。この塩基配列は、822 bpであり、Metで始まる371個のアミノ酸からなる分子量29,637のブリックレオシドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端20個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌ブリックレオシド・オホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0032】次に、ピリミジンスクレオシト・オホリラーゼ構造遺伝子を含有するとと思われる2.8 kbのDPS1-Hecori DNA断片に関しては、pUC119及びpUC119に各種制限酵素を用いてショットガレンセブクローンングを行い、先と同様ダイディオキシチニティダーマーマーマー法でその塩基配列を決定した。その結果、図3および4に示すピリミジンスクレオシト・オホリラーゼ構造遺伝子を得た。この塩基配列は、1,298 bpであり、433個のアミノ酸からなる分子量46,271のブリックレオシドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端10個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌ピリミジンスクレオシド・オホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0033】実施例2:好熱菌スクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクターの作製

ブリックレオシド・オホリラーゼ生産用組換えベクターpTrec-pvnAを以下の方法で作製した(図5参照)。すなわち、プラスミドベクターpTrec94A(Gene, 69, 301(1968)、Pharmacia社より入手)を制限酵素NcoI及びSmaIで切断後、ブリックレオシド・オホリラーゼ構造遺伝子及びさり配列を含有するNcoI-HpaI DNA断片と上記ブリックミトベクターpTrec94Aの切断断片とをT4-DNAリガーゼを用いて連結し、該連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られたアービカル耐性形質転換体より、pTrec94Aの発現用rec-プロモーターの直後にS1配列及びブリックレオシド・オホリラーゼ構造遺伝子が挿入された組換えベクターpTrec-pvnAを得た。

【0034】次に、ピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクターpTrec-pvnを作製した(図6参照)。すなわち、先の4.6 kbのDNA断片を制限酵素BamHIで部分分解し、さらにその生成物にT4-DN

アミノ酸を用いてPstI, KpnIを連結して、後述の成物は、アミノ酸側酵素PstIの切断部位と、KpnI側酵素を含む約2.2 kbのpTrc119-NNA断片を調製した。このpDNA断片と制限酵素PstIで切断したpTrc99Aを用いて、ゲノム用いて連続反応を行って、さらに該反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られたアミノ酸側酵素形質転換体より、pTrc99A-pTrcNEを得た。直後のPstI切断部位にアミノ酸配列及びそのS1プロセラーゼ活性が、また、S1プロセラーゼ構造遺伝子がpTrc99Aプロモーター側の転写方向と一致して挿入された組換えベクターpTrc-psyを得た。

〔(0-3-6)〕さて、好熱菌Bacillus stearothermophilusを用いて及びビリミンオキシダーゼ、ホスホリラーゼ酵素生産用ベクター、pTrc-NEを作製した(図7参照)。すなわち、先に4.6 kbのpDNA断片より酵素構造遺伝子及びそれとのS1プロセラーゼ配列を含有する Neot-EcoRI I-DNA断片と制限酵素 NeotI 及び EcoRI Iで切断したpTrc99Aを用いてNNAアミノ酸を用いて連結し、その連続反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られたアミノ酸側酵素形質転換体より、pTrc99A-pTrcプロモーター直後のNeot-EcoRI切断部位にブリヌスクレオシド、ホスホリラーゼ及びビリミンオキシダーゼ、ホスホリラーゼのS1プロセラーゼ配列及び構造遺伝子が挿入された組換えベクターpTrc-NEを得た。

*

*【(0-3-7)】実施例3-7形質転換体の培養：酵素抽出液中に3種類の組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体を、[pTrc99A-pTrcNE]を含有する大腸菌各地域より而して植菌し、3-7日間培養した。10mlの1個、1mlに満たず時内で、培養液に終濃度1.5Mとなるようにヒドロキシ酸を添加し、さらに2.5mlの封管振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離し、10mlの1個分間により培養菌体を回収し、10mlの緩衝液にて洗浄した。次に、1mlの1個を用いて、MgCl₂ 50 mM、ATP 0.1 mM、DTT 0.1 mM、EDTA 0.1 mM、pH 7.0に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1.0Mとなるように、1.5Mのヒドロキシ酸を加え、3.7日間一時間保温することで形質転換体を溶解させ、さらに遠心分離し、10mlの1個を用いて菌体残渣を除去した。このようにして得られた、清濁分を液体抽出液とした。液体抽出液におけるブリヌスクレオシド、ホスホリラーゼ活性を好熱菌Bacillus Trabeculatusを保持する大腸菌JM105、及びpUC119-PYRC(特開平4-44972)を含有する大腸菌JM109と共に下記表に示す。なお、ブリヌスクレオシド、ホスホリラーゼ活性は、山内の方法(特開平4-48863)に従い、7.0におけるそれぞれイノシル及びウレジンの加水分解活性を測定して算出した。

【(0-3-7)】

【表1】

菌株	ブリヌスクレオシド分解活性		ホスホリラーゼ分解活性	
	(units/mg protein)	(units/mg protein)	(units/mg protein)	(units/mg protein)
JM105/pTrc99A	0.9		1.1	
JM105-pUC119-PYRC	1.7		1.1	6
JM105-pTrc-psyA	13.4	8	測定せず	
JM105-pTrc-psyB	測定せず		14.0	13
JM109-pTrc-NE	13.4	7	6.0	0

*[0-3-7] 〔(0-3-6)〕と同様の方法で作成した。

**[0-3-7] 〔(0-3-6)〕と同様の方法で作成した。

〔(0-3-8)〕表1に示すように作製した組換えベクタータン保有する形質転換体においては、好熱菌Bacillus Trabeculatusを保持する大腸菌JM109の1.3-1.6倍以上の収量で活性を有するブリヌスクレオシドホスホリラーゼ活性が確認された。また、本発明で造成された形質転換体(pTrc-NE保持菌)は、従来法(特開平4-48863)で造成された形質転換体(pUC119-PYRC保持菌)の6-8倍のブリヌスクレオ

シド、ホスホリラーゼ活性を生産できることも確認された。また、この形質転換体の生産性は既存である好熱菌Bacillus stearothermophilus TH6-2株の約8倍に相当する。なお、これら組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体より調製されたブリヌスクレオシド、ホスホリラーゼは、好熱菌由来の酵素と同等の性質を有していた。

【(0-3-9)】実施例4：培養菌体を用いたブリヌスクレオ

アナログ(リバビリン)の合成

実施例3と同様の方法で得られたpTrc-NEを保持する大腸菌JM109株の培養液1.0mlより遠心分離により培養菌体を回収し、1mlの生理食塩水に懸濁した。この菌体懸濁液に塩基供与体として4.0mM 1, 2, 4-トリアゾール-3-カルボキサミド(以下、「トリアゾール」と略称する)、また糖残基供与体として6.0mMのウリジンを含有する1.0mM リン酸緩衝液(pH 6.0, 0.9ml)を添加し、45℃で1時間反応させリバビリンを合成した。生成したリバビリンは、文献の方法(国際特許公開WO 90/10080号)に従い、HPLCでリバビリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.2%でリバビリンが合成された。また、副産物の生成は認められなかった。

【0040】実施例5 菌体抽出液を用いたスクレオシドアナログ(リバビリン)の合成
実施例4と同組成のトリアゾール、ウリジンを含有するリン酸緩衝液(1.0ml)に、実施例3で調製された形質転換体JM109/pTrc-NE由來の菌体抽出液を1.86μl添加(終濃度グリジンスクレオシド・ホスホリラーゼ10unit/ml、ビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ1.5unit/ml)して、50℃で8時間反応させた。実施例4と同様の方法でリバビリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.0%でリバビリンが合成されていることが確認された。また、先と同様、副産物の生成も認められなかった。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由來のグリジンスクレオシド・ホスホリラーゼ及

びビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有する4.8kb SacI-EcoRI DNA断片の制限酵素地図を示したものである。

【図2】図2は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由來のグリジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Met.はグリジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドンを、stopはその停止コドンを、Met. of gppmはビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドンをそれぞれ示す。

【図3】図3は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由來のビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Met.はビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドンを、stop of gppmはグリジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の終了位置をそれぞれ示す。

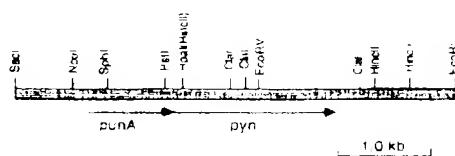
【図4】図4は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由來のビリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、stopはその停止コドンを示す。なお、図3及び4に示された塩基配列は一連の連続した塩基配列である。

【図5】図5は、組換えプラスミドベクター pTrc-punAの構築法を示したものである。

【図6】図6は、組換えプラスミドベクター pTrc-pynの構築法を示したものである。

【図7】図7は、組換えプラスミドベクター pTrc-NEの構築法を示したものである。

【図1】



(20)

100 200 300 400 500 600
 ATGGAAAT ACCCTGTTG ATTACAA AGAATATAGA GAAATATTC TAAAGCTT
 110 210 310 410 510 610
 TGTGATAGG CAAACATCA AAGGAA GAAAGAATTTA ATTCGAAAT TCTTCTAA
 120 220 320 420 520 620
 TATAGCTGA ACCATTGCGC AAAACCTTTC TCTTAAATG GAAATATC GAAACCTT
 130 230 330 430 530 630
 TTAACAGAC TTGAAATAAG GGCGCGAA ATATGAAAT GAAATATTC GAAACCTT
 140 240 340 440 540 640
 TAAATTTC AAAAGAAAAG TTTCGAACT GAAACAAAT GGG TAAATT TTGCGTCTG
 150 250 350 450 550 650
 TTAGCTCT TTGGCCGT GAGATTCAGA AAATTTAA ATTCGCTTAC AGCGA ATT
 160 260 360 460 560 660
 GAAATTCC TGTGAGACG CTTGAAAGGC A AAGGTTCA GCTCTTATAC GCTGAGTTAG
 170 270 370 470 570 670
 AAGGAAAC AGTAGTCGTT ATGCAAGCG CTTTCATTA TTACGAAAGGA TACAGCTTA
 180 280 380 480 580 680
 ATAAGCTAAC GTTCCCTGTC CGCGTGAAGA AAGCTTGTG TGTGAGGAG GAAATGTTA
 190 290 390 490 590 690
 GAAATCCGGC AGGTGGCTAA AATCAATCTT TTTGAAACCGG CGATTAAATG ATTATTCAG
 200 300 400 500 600
 ATCATATTAA TAACATGGGC GGCATCCCC TTATCGGCC GAAATGATTCT GCACTTGGG
 210 310 410 510 610 710 810
 TCCGCTTCC AGACATGTCG GAAACATATA GAAACGAACT TTGTCAACTT GCAAAGATG
 220 320 420 520 620 720 820
 TAGCAAACCA CTCGGTTTA CCTGTCGGCG AAGGTCTGTA TGTGCAAT ACGGGTCA
 230 330 430 530 630 730 830
 CCTATGAAAC CGCGGAGAA ATTCGATCA TTGCTCTAT GCTGCGGAT CTTGCGG
 240 340 440 540 640 740 840
 TTCAACGGT GCTGAACTG ATGGTCCGGC GCAATGGCG GATGGAACCTT CTGGG ATTC
 250 350 450 550 650 750 850
 TTGATTTT GAAATATGCT GCAATTAAT GAAATGAGC GAAATGGAT GATAAATTA
 260 360 460 560 660 760 860
 TCAAA GAA GAAAGAAAGTA AAAATGAAAT TTGATGTT TGTGAGCTT ATTCGTTA
 270 370 470 570 670 770 870
 GAAATGAA AAATTAAGG AGAGTTGAAAGG GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG
 280 380 480 580 680 780 880
 GAAATGAA GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG
 290 390 490 590 690 790 890
 GAAATGAA GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG GAAATGGCG
 300 400 500 600 700 800 900

【図3】

10 20 30 40 50 60
 CTGCACTAT TTTACATCA CGCCTTACCC ATCATGAAC TATCGAAACG ACGGAARAAAC
 PstI
 70 80 90 100 110 120
 TAAAAGCTGA CTTTTTACGA TTTGTGAAGC CGATCGTACG CAACATGCCG AAAAATTAAG
 130 140 150 160 170 180
 CGAGAAGGTG AACGACGATG AGAATGGTCG ATTTAATTCGA CAAAAAACCT GATGGTCATG
 S.D. Met
 190 200 210 220 230 240
 CGTTAACGAA AGAAGAAATT CACTTTATTA TTCAAGCTTA CACAAACGC GATATTCTG
 250 260 270 280 290 300
 ATTATCAAAT GAGCGCATTA CGCATGCCA TTTTTTCCG CGCCATGAAAT GAAGAAGAGA
 310 320 330 340 350 360
 CACCGGAATT GACCATGGCG ATGGTCCATT CAGGGATAC GATCCACCTT TCGCCAAATG
 370 380 390 400 410 420
 AAGGAATTAA AGTAGACAAA CATTCAACCG GCGGAGTGGG CGATACAACA ACCTTACTGC
 430 440 450 460 470 480
 TTGGCCCTCT TGTGGCCCTCC GTCCGGTGTTC CGGTTGCGAA AATGTCCTGGG CGGGCCCTG
 490 500 510 520 530 540
 GACATACGGG TGGAACGATC GACAAACTAG AATCGGTGCC AGTTTTCAC GTTGAATTA
 550 560 570 580 590 600
 CGAACGATGA ATTATATCGAT CTTGTCAATA AAAATAAAAT TGCCGTTGTC GGTCACTCTG
 610 620 630 640 650 660
 GTAATTITGAC GCCAGCGGAC AAAAAGTTCT ATGGCCTTCG TGATGTGACG GCAACGCTCA
 670 680 690 700 710 720
 ATACCATTCC GTTAATTGCC TCAATCGATTA TGAGCAAAAA AATTGCCGCA GGGGCAGATG
 730 740 750 760 770 780
 CGATCCTACT TGACGTAAAA ACAGGTGTCC CGCCGTTTAT GAAAGATTAA AACCATGCCA
 790 800 810 820 830 840
 AAGCATTAGC GAAACCGATG CTCGATATCC GAAATGCCCT TGCCGCTAAA ACGATGCCA
 850 860 870 880 890 900
 TTATTTCTGA TATGAGCCAG CGCGTTGCT ATGGCATTCC AAATGCCCTT GAACTGAAAC
 910 920 930 940 950 960
 AAGCGATTGA TACGTTAAAA CGAGAAGCTC TACAAAGTTT CGAACACCTG TGCTTAAG
 970 980 990 1000 1010 1020
 TTGGTAGCUA CATGGTATAT TTACCGGAAA AACATCTTC GGTGAAGAA GGTGGTATA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TGTAGAAAA AGCGATGAAA GACGGTCAAG CGTTCAGAAC ATTTAAACG TTCTTACG

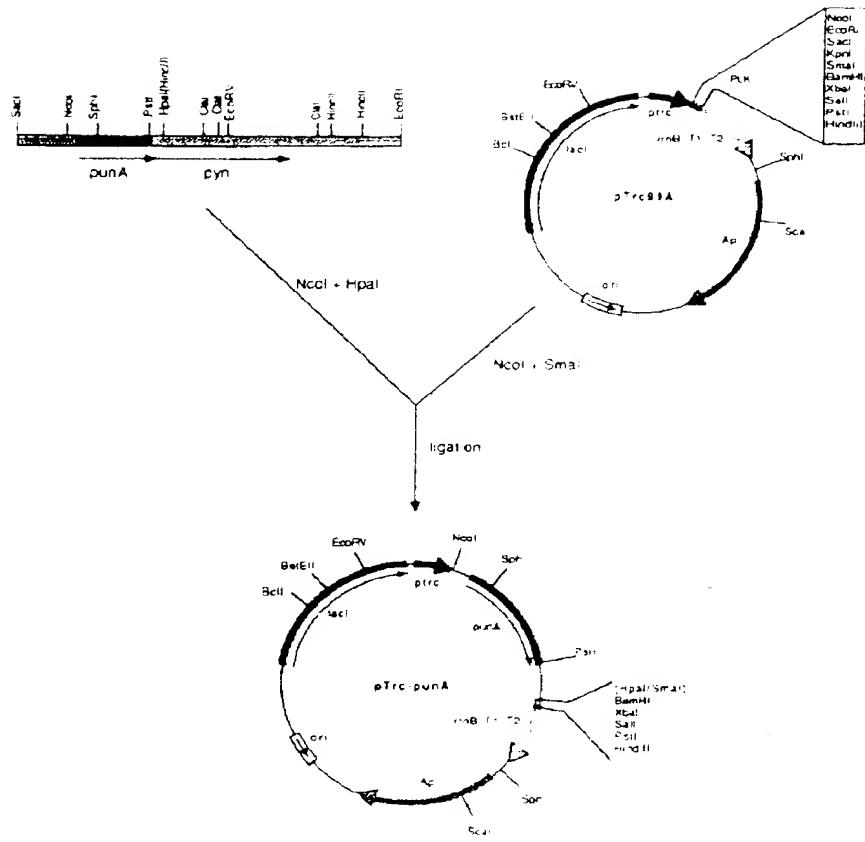
(その1)

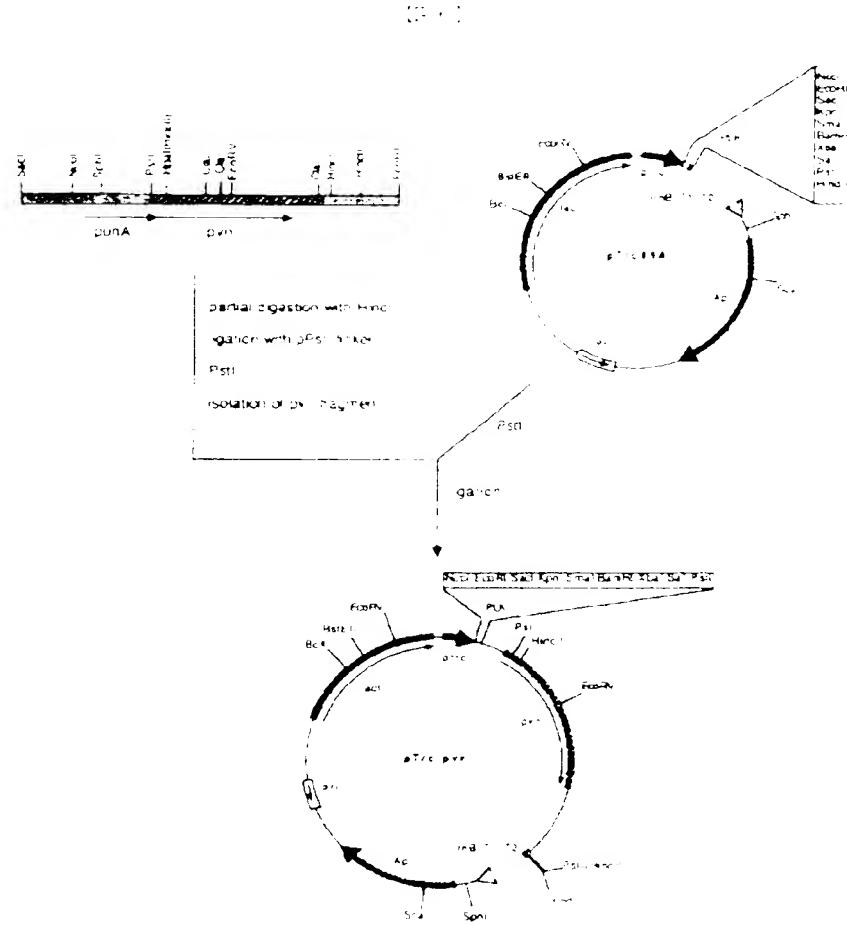
(24)

1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TCCAACTGCTG CAAATGATCT GTTCTCCGATG AGCCAGCTGA ATGAGCTAA GAAATGAA
 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TTATTCGACT AAGAAGGAAA GAAATGGAT ATGATACGCA GATTTTGCG GATGCG
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GAAAGGCGG CATGTCGCTT GCTCCGAGG GAGGAGGAA AGAAATGAA GATGAA
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GCTGCGCTT GCTGCTTCGG AAAGAACTGG CTCGATGGGT AAAAAAAGGT GAAAT GCTG
 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TTACAAATTG CACCAACCGT GAAACAGCTG ATGATGAAAG AAAAAAAAGT TACGAAACA
 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TTCTTATTC ACCAACACCT GTPCAAGCTG GAAACATTAAT TTGAGATAAA ATTTGAA
 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GTCGAAGGATT CATTCCCTCA GGTTCCTTTTA TGTATAAAA AATAAAAAT GGAAAGGATT
 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GCAACTGAA AGAAATGGAG GCTTGGAGAT GAAACGATT TTCTGATCT TTCTTAT
 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GTTTCTTTTTT CTTCCAAGCG TCGTTGTCG GGGCGAACAG TCGAAATTG AAATGAA
 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TGAGGCCCGA TCAGCAATTG TAATTGAGAG AGACACAGGG GCTGTTTCT ATGAAAAAA
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 TGGCCATGAG CGCGTTCCAC CAGCGAGCAT GACGAAATT ACGACATGCG TTCTCATAT
 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 GGAACCGATT GATCAAGGAA AGTTGAAGAT AGACGAGCGA GTGGGGCAA CTGAATAAGG
 1710
 TOCATCGAT
 CtaT

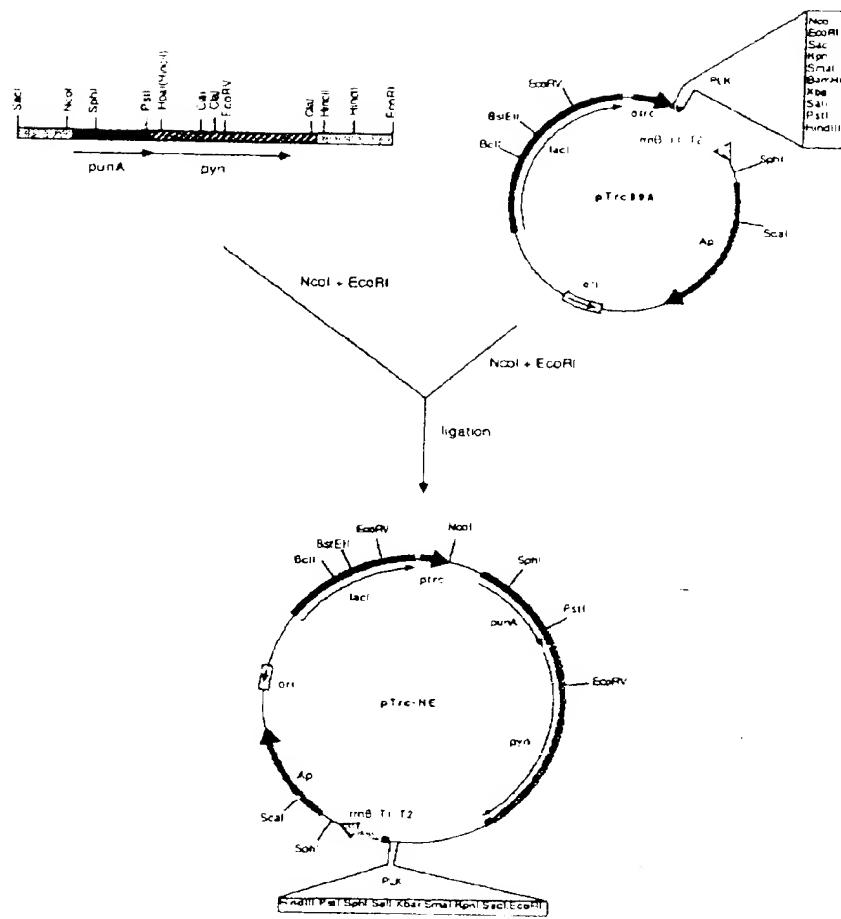
(その2)

【図5】





【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.
A7C 1/2 N 15/54
C 1/2 R 1:07)
(C 1/2 N 1:21
C 1/2 R 1:19)
(C 1/2 N 9:10
C 1/2 R 1:19)

識別記号 廣内整理番号

F 1

技術表示箇所

